

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	病原性酵母 <i>Candida albicans</i> における菌糸形成阻害剤の探索と二形性形態変換機構の解析
氏 名 (Name)	佐藤 達記

カンジダ症は病態によって、皮膚の表面にあらわれる表在性真菌症と内臓等にあらわれる深在性真菌症に分類され、深在性真菌症は、真菌が肺、肝臓、脳など、体の深部に入り込んで感染を起こす感染症で予後不良なことが多い。日本における深在性カンジダ症の 30-50%は *Candida albicans* を起因菌として発症し、*C. albicans* により引き起こされる深在性カンジダ症は、その制御が難渋する感染症の一つとなっている。

C. albicans は生育環境に応じて酵母形と菌糸形の 2 つの形態を呈する二形性真菌で、酵母形から菌糸形への二形性変換は、生育温度や pH などの外部環境や血清等による誘導物質によって引き起こされる。菌糸形成は本菌の病原性と関連しているため、二形性変換の解明は、病原性の解明並びに新たな治療薬の開発に重要である。本研究では、*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解明、菌糸誘導条件の単純化、並びに菌糸形成阻害剤の探索を行った。

第 2 章では、*C. albicans* の形態変換に関与する 2 つのシグナル伝達系の解明を行った。まず、クオラムセンシング分子 farnesol による菌糸形成阻害メカニズムを解明した結果、farnesol は mitogen-activated protein キナーゼの系を抑制することにより菌糸形成を阻害していることを明らかにした。続いて、*C. albicans* の菌糸形成時における Ca^{2+} /カルモジュリンシグナルの解明を行った。カルモジュリン阻害剤による菌糸形成の阻害には、cyclic adenosine monophosphate 依存性プロテインキナーゼ (以下 cAMP-PKA) の系で制御されている菌糸特異的 mRNA の発現の抑制が関与していることを明らかとした。さらに、カルモジュリン阻害剤は、菌糸誘導時において菌体内 cAMP の生成に影響を与えなかったため、*C. albicans* の Ca^{2+} /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の系の cAMP よりも下流、又は、cAMP-PKA の系とは別の経路から菌糸特異的 mRNA の発現を誘導し、菌糸形成を引き起していると考えられた。

第 2 章では *C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解析による二形性変換の解明を行ったが、ここで *C. albicans* の菌糸誘導条件について着目した。広く使用されている *C. albicans* の菌糸誘導条件は、温度 (37°C)、CO₂、や pH などの環境条件や、菌糸誘導因子である血清、*N*-アセチルグルコサミン (以下 GlcNAc)、又は特定のアミノ酸等を YPD 培地、DMEM 培地、又は RPMI-1640 培地等の基礎培地に添加して培養する条件であるが、これらの条件には、添加される菌糸誘導因子に加え、基礎培地中の炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、pH、及び CO₂ などの様々な因子が含まれている。さらに、これらの成分や濃度は基礎培地間で異なる。このような様々な因子が入り混じった複雑な菌糸誘導条件下で細胞内シグナル伝達系の解析による二形性変換の解明は難しいと考え、まず菌糸誘導における不要な因子を排除し菌糸誘導条件の単純化を図ることが *C. albicans* の二形性変換の解明に必要と考えた。

第 3 章では、複雑な菌糸誘導条件を単一成分まで単純化し、*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こす誘導因子の同定を行った。RPMI-1640 培地を用いて菌糸誘導因子の同定を検討した結果、プロリンを特定す

ることができた。プロリンは 0.02 mM 以上を単独で水に添加するだけで菌糸誘導を引き起こせることを明らかとした。これにより、単純化した *C. albicans* の菌糸誘導条件を確立することができた。

第4章では、プロリンアナログ等をスクリーニングし菌糸形成阻害剤の探索を行った。その結果、L-azetidine-2-carboxylic acid (以下 AZC)、L-4-thiazolidinecarboxylic acid (以下 T4C)、及び α -N-methyl-L-proline (以下 mPro) が効果的な菌糸形成阻害剤として特定することができた。これらの化合物は、プロリンアナログでありながら、プロリンによる菌糸誘導だけでなく GlcNAc による誘導も阻害し、それぞれで、その阻害効果が異なっていた。AZC はプロリンと GlcNAc の両方を阻害できたが、T4C はプロリンに対して阻害を示し、mPro は GlcNAc を阻害した。これらのことから、プロリンと GlcNAc の菌糸誘導には関連があるものの、その誘導経路は別々に存在していることが示唆された。血清にはプロリンと GlcNAc が含まれているため、これらが血清による菌糸誘導の主因子と仮説を立て、プロリンアナログによりプロリンと GlcNAc を阻害することで血清による菌糸誘導を阻害できるか検証した。AZC、T4C、及び mPro は、血清による *C. albicans* の菌糸形成を阻害できたため、血清による主な菌糸誘導因子はプロリンと GlcNAc であることを明らかとした。さらに、AZC 単独、又は T4C と mPro の併用によってプロリンと GlcNAc の両経路を阻害することで、高濃度の血清でも菌糸形成を阻害できた。さらに、AZC 又は T4C と mPro の併用は酵母形での細胞増殖に影響を与えることなく血清による *C. albicans* の菌糸誘導を阻害できた。これらの薬剤は、*C. albicans* に対して増殖抑圧をかけることなく菌糸形成を抑制できたため、プロリンと GlcNAc の阻害を標的とする薬剤は、薬剤耐性菌の出現しづらい新たな治療薬の開発につながると考えられた。

以上、本研究では、菌糸誘導の単純化によるアプローチにより、*C. albicans* の血清による菌糸形誘導因子の特定と効果的な菌糸形成阻害剤を発見することができた。

(様式 9 号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	佐藤 達記
審査委員	主 査： 赤田 倫治
	副 査： 吉本 誠
	副 査： 星田 尚司
	副 査： 通阪 栄一
	副 査： 吉本 則子
論文題目	病原性酵母 <i>Candida albicans</i> における菌糸形成阻害剤の探索と二形性形態変換機構の解析 (Development of hyphal formation inhibitors and analysis of dimorphic transition mechanism in the pathogenic yeast <i>Candida albicans</i>)

【論文審査の結果及び最終試験の結果】

カンジダ症は、主に *Candida albicans* を起因菌とする真菌症であり、皮膚表面にあらわれる表在性と内臓等にあらわれる深在性カンジダ症がある。後者は、重症化しやすく、その制御が課題となっている。*C. albicans* は酵母形と菌糸形の形態を示す二形性真菌であり、菌糸形への形態変化によるバイオフィルム形成が治療を困難にする要因である。そこで、本研究では、菌糸形成へ至るメカニズムの解析、菌糸形成誘導物質の同定、さらに、その物質のアナログによる菌糸形成阻害剤の探索を行っている。まず、第1章ではカンジダ症の背景と問題点を考察している。

第2章では、*C. albicans* の形態変化のメカニズムの解析を行っている。これまでに、菌糸形成は、主に、cAMP 依存性プロテインキナーゼ経路か、または、MAP キナーゼ経路で活性化されることが知られている。そこで、菌糸形成を阻害するクオラムセンシング分子 farnesol は、どちらの経路を抑制するのかを発現解析により検討した。この結果、farnesol は、MAP キナーゼ経路を抑制することが示唆された。次に、形態変化に関わる Ca^{2+} シグナル経路の解析を、 Ca^{2+} /カルモジュリン阻害剤を利用して行ったところ、これらは、cAMP 依存性プロテインキナーゼ経路を抑制することが示唆された。

第3章では、これまでに様々な成分を含む培地による菌糸誘導が調べられてきたが、これを単純化し、単独で菌糸誘導を引き起こす因子の同定を行った。RPMI-1640 合成培地の既知成分を分類、探索し、アミノ酸のプロリンが 0.02 mM 以上の低濃度でも菌糸を誘導することがわかった。一方で、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)も単独で菌糸誘導を引き起こすことが知られている。

第4章では、プロリンによる菌糸誘導を阻害するために、複数のプロリンアナログの菌糸誘導阻害活性が調べられた。2種のアナログ AZC 及び T4C がプロリンによる菌糸誘導を強く阻害した。一方、GlcNAc による菌糸誘導に対して、プロリンアナログの効果を調べたところ、AZC が GlcNAc による誘導を強く阻害したが、T4C による阻害効果は弱かった。興味深いことに、プロリンによる誘導を全く阻害しなかったプロリンアナログ mPro が GlcNAc による誘導を強く阻害した。これらのことから、プロリンと GlcNAc は別々の経路で誘導するが、経路のどこかで、2つの経路が交わっていることが示唆された。したがって、生体内においては、プロリンと GlcNAc の両誘導経路を同時に阻害することが必要であると考えられた。生体内における菌糸誘導を模倣するため、血清による菌糸誘導をこれらのアナログが阻害できるかどうかを検証した。AZC は単独で血清による菌糸誘導を強く阻害することができたが、プロリンを阻害するが GlcNAc の阻害が弱い T4C と、GlcNAc の阻害はできるがプロリン誘導の阻害ができない mPro はどちらも単独では菌糸誘導阻害能力が低かった。しかし、この2つのアナログを混合して使ったところ、血清による菌糸誘導を強く阻害することがわかったので、生体内では、プロリンと GlcNAc が存在し、2つが別々に菌糸を誘導する

(様式 9 号)

ため、どちらか一方を阻害するのではなく、同時に阻害することで、菌糸形成を強く抑制することが可能であることが示された。以上の結果、本研究では、*C. albicans* における 2 つの菌糸誘導条件を阻害する新しい薬剤候補を提案することになった。

公聴会における主な質問内容は、1) 生体内での血清濃度に近い条件での実験なのか、2) 探索したプロリンアナログの生体への影響はあるのか、3) アナログの使用法としてドラックデリバリーを考えているのか、4) これまでにどのような阻害剤が実際に使われてきたのか、5) 製剤化にはどのような問題があるのか、6) ヒト血清とウシ血清では成分の違いはあるのか、7) 血清中の菌糸誘導物質は、プロリンと GlcNAc の 2 つであると考えてよいのか、などであった。いずれの質問に対しても発表者からの確かな回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士（生命科学）の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。（関連論文 計 3 編）

(1) Tatsuki Sato, Toshihiko Watanabe, Takeshi Mikami, and Tatsuji Matsumoto: Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans*, Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 751-752 (2004)

(2) Tatsuki Sato, Yukihiro Ueno, Toshihiko Watanabe, Takeshi Mikami, and Tatsuji Matsumoto: Role of Ca^{2+} /Calmodulin Signaling Pathway on Morphological Development of *Candida albicans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1281-1284 (2004)

(3) Tatsuki Sato, Hisashi Hoshida, and Rinji Akada: Inhibition of Distinct Proline- or N-Acetylglucosamine-Induced Hyphal Formation Pathways by Proline Analogs in *Candida albicans*. *BioMed Research International*, vol. 2020, Article ID 7245782, 10 pages (2020)
<https://doi.org/10.1155/2020/7245782>